

Caracterización de la secuencia del gen de la proteína transportadora de péptidos (PepT1) en alevines de paiche *Arapaima gigas*

Characterization of the gene sequence of the peptide transport protein (PepT1) in paiche *Arapaima gigas* fingerlings

Odalís E. Toledo^{1,2,4}, Arnaldo E. Castañeda^{1,2}, Manuel A. Feria^{1,2},
Pedro Masías², Mario Cueva³, Emmerik Motte²

RESUMEN

El objetivo del estudio fue caracterizar el PepT1 del paiche *Arapaima gigas* mediante herramientas genómicas y proteómicas. Se realizó un análisis transcriptómico y proteómico a partir de secciones del intestino, bazo, hígado y riñón de alevines. El análisis transcriptómico permitió obtener dos secuencias consenso de 357 y 459 pb. Ambos fragmentos presentaron un alto grado de homología (78 y 80%), principalmente con secuencias de nucleótidos codificantes del PepT1 de *Scleropages formosus* del mismo Orden que el paiche. El análisis proteómico por espectrometría de doble masa MALDI TOF/TOF permitió identificar quince secuencias peptídicas del PepT1 en paiche. Como conclusión se logró caracterizar parcialmente el PepT1 en el intestino del paiche, las cuales podrán ser usadas para posteriores estudios sobre la evaluación de su expresión.

Palabras clave: *Arapaima gigas*; proteína transportadora de péptido; PepT1; proteómica; espectrometría de masas; MALDI TOF/TOF

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the PepT1 of pirarucu *Arapaima gigas* through genomic and proteomic tools. A transcriptomic and proteomic analysis was made from sections of the intestine, spleen, liver and kidney of fingerlings. The transcriptomic analysis allowed obtaining two consensus sequences of 357 and 459 bp. Both fragments showed a high degree of homology (78 and 80%), mainly with nucleotide

¹ Facultad de Pesquería, Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, Perú

² Empresa de Formación e Investigación en Biotecnología Molecular, INCABIOTEC SAC, Tumbes, Perú

³ Cooperativa de Trabajadores Biotecoop, Tumbes, Perú

⁴ E-mail: Odat68@gmail.com

Recibido: 2 de noviembre de 2018

Aceptado para publicación: 28 de mayo de 2019

sequences coding for the PepT1 of *Scleropages formosus* of the same Order as *A. gigas*. The proteomic analysis by double mass spectrometry MALDI TOF/TOF allowed to identify 15 peptide sequences of PepT1 in pirarucu. In conclusion, PepT1 was partially characterized in the intestine of pirarucu, which could be used for further studies on the evaluation of its expression.

Key words: *Arapaima gigas*; peptide transporter; PepT1; proteomic; mass spectrometry; MALDI TOF/TOF

INTRODUCCIÓN

El paiche *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), es una especie importante de la ictiofauna amazónica que pertenece a la familia Osteoglossidae. Se caracteriza por su elevada tasa de crecimiento (10-15 kg por año) y excelente sabor de su carne (Rebaza *et al.*, 2010), convirtiéndose en una especie con gran potencial en la acuicultura peruana. No obstante, una de las principales limitantes para su producción sostenible e intensiva es la nutrición (Oeda *et al.*, 2015), de allí que se realizan estudios sobre la tasa de ingestión y digestión para el desarrollo y formulación de dietas, utilizando fuentes alternas de nutrientes (DIDIT, 2017).

Los peces, en especial los alevinos, requieren de altas cantidades de proteínas que, asimiladas de manera eficiente una vez reducidas a dipéptidos y tripéptidos, son empleados para su crecimiento y fuente de energía (Gatlin *et al.*, 2007; Verri *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013). Las proteínas son sometidas a un proceso de digestión en el estómago, cuyos productos ingresan al intestino delgado para ser degradados por las enzimas pancreáticas generando productos como aminoácidos, oligopéptidos absorbibles y di-tripéptidos (Kiela y Grishan, 2016), que son llevados por proteínas transportadores de péptidos (Verri *et al.*, 2011) a través de la membrana celular de los enterocitos (Gilbert *et al.*, 2008).

El péptido transportador 1 (PepT1), categorizado como miembro de la familia 15, portadoras de soluto A1 (SLC15A1), es el principal conductor de nutrientes debido a su transporte no selectivo y alta capacidad de función para tri y di péptidos a partir del lumen intestinal hacia el interior de los enterocitos (Segura *et al.*, 2010). El PepT1 se localiza principalmente en el borde de cepillo de las células epiteliales del intestino (Wang *et al.*, 2017), posee un tamaño de aproximadamente 700 aminoácidos (\approx 2100 nucleótidos) en vertebrados superiores, mientras que en la mayoría de los vertebrados inferiores es usualmente más grande (Ostaszewska *et al.*, 2010). Sin embargo, la secuencia de aminoácidos como de nucleótidos son altamente conservadas en comparación con los vertebrados superiores (Rønnestad *et al.*, 2014). Además, posee 12 dominios transmembrana, con los terminales carboxilo y amino en el sitio citoplasmático (Daniel, 2004), y dos isoformas: PepT1a y PepT1b (Bucking y Schulte, 2012).

El PepT1 se expresa principalmente en el intestino anterior (Rønnestad *et al.*, 2007; Bakke *et al.*, 2010), pero también ha sido detectado en otros tejidos como branquias, cerebro, corazón, hígado, bazo y riñón en niveles muy bajos (Wang, 2017). Además, es regulada por una variedad de hormonas como factores de crecimiento epidermal, ritmo diurno y principalmente por el contenido de proteína en la dieta (Liu *et al.*, 2013). Estudios sobre el PepT1 se han dirigido principalmente

a su secuencia, estructura, función, expresión, lugar de distribución (tejido/órgano), y factores ambientales en diferentes variedades de especies de peces (Bakke *et al.*, 2010), tales como *Anguilla anguilla* (Storelli *et al.*, 1989; Thamotharan *et al.*, 1996), pez zebra *Danio rerio* (Verri *et al.*, 2003), carpa común *Cyprinus carpio* (Ostaszewska *et al.*, 2009), salmón del atlántico *Salmo salar* (Rønnestad *et al.*, 2010) y trucha *Oncorhynchus mykiss* (Ostaszewska *et al.*, 2010). Sin embargo, hasta la fecha, no existe investigaciones sobre la caracterización del PepT1 en el tracto gastrointestinal del paiche *A. gigas*.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar molecularmente la proteína transportadora de péptidos (PepT1) del intestino de paiche *A. gigas* mediante técnicas genómicas y proteómicas, para generar una base de datos para posteriores estudios sobre la regulación de su expresión, y el potencial en la formulación de alimentos para el paiche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Alineamiento de Secuencias y Diseño de Cebadores

Se recopilaron 16 secuencias de ADNc del PepT1 de teleósteos evolutivamente cercanos con el paiche (Cuadro 1), a partir de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/). La homología entre secuencias se analizó mediante Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) y el alineamiento múltiple mediante el programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tolls/msa/clustalw2/>). A partir de la secuencia conservada se realizó el diseño de los iniciadores degenerados (Cuadro 2), los cuales fueron sintetizados por la empresa Integrated DNA Technologies (IDT, USA).

Muestras y Preparación de Tejidos

Se utilizaron 15 alevines de paiche de aproximadamente 15 cm de longitud, obtenidos de una empresa local, ubicada en el departamento de Tumbes, Perú. Los peces fueron eutanasiados, previa sedación con eugenol (Acuestrol®) en solución al 1% del stock. Se realizó una apertura en la cavidad abdominal y se hizo un raspado del epitelio intestinal de las regiones anterior, medio y posterior. Además, se colectaron muestras de riñón, hígado y bazo (<0.5 cm). Los tejidos fueron preservados en RNAlater (Ambion, Austin, TX, USA) y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

Extracción de ARN Total y Síntesis de ADNc

La extracción de ARN total de los tejidos se realizó con el kit GeneJET RNA Purification (Thermo Fisher Scientific, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cadena de ADNc fue sintetizada utilizando el kit ReverdtAid™ Reverse Transcriptase (Fermentas®) en presencia del iniciador Oligo dT18 en una reacción de 20 µl, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante y sujeto a tratamiento con DNase (DNase I, Thermo Fisher Scientific).

Optimización de PCR para Iniciadores Degenerados

El ADNc fue amplificado en volúmenes de 25 µl, conteniendo 0.04 Unidades de Hot Start Taq DNA polimerasa (Thermo Fischer Scientific), solución de tampón de la polimerasa a 1X, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTPs, 0.6 y 1.2 µM para los iniciadores degenerados y el control interno 18S rRNA, respectivamente, ADNc y agua libre de nucleasas (AUP). Se determinó la temperatura de hibridación óptima para cada juego de iniciadores de acuerdo con las temperaturas de fusión (*melting*) (Cuadro 3) y los productos amplificados fueron separados por

Cuadro 1. Número de acceso de las secuencias del ADNc del PepT1 de peces

Nº de accesoión	Especie	ARNm (pb)	Aminoácidos (aa)
EU160494.1	<i>Sebastes nebulosus</i>	2640	742
NM_198064.1	<i>Danio rerio</i>	2637	718
JN896885.1	<i>Cyprinus carpio</i>	3118	723
JN088166.1	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	2761	713
AB762417.1	<i>Anguilla japonica</i>	2952	723
AB455540.1	<i>Salmo salar</i>	2629	734
JN615007.1	<i>Fundulus heteroclitus</i>	2807	722
KC476396.1	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	2684	729
LC167343.1	<i>Oreochromis mossambicus</i>	2787	727
AY170828.2	<i>Chionodraco hamatus</i>	2845	757
KC485004.1	<i>Larimichthys crocea</i>	2923	726
GQ906471.2	<i>Perca flavescens</i>	2956	729
XM_018729534.1	<i>Scleropages formosus</i>	2046	676
FJ237043.2	<i>Dientrarchus labrax</i>	2184	728
AY921634.1	<i>Gadus morhua</i>	3014	727
JX177494.1	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	2328	725

Cuadro 2. Iniciadores usados para la transcriptasa inversa-PCR del ADNc del PepT1 en paiche (*Arapaima gigas*)

Iniciador	Secuencia 5'-3'	T _m (°C)	Tamaño (pb)
<i>18S rRNA F</i> ¹	TACCACATCCAAAGAAGGCAG	54.9	200
<i>18S rRNA R</i> ¹	TCGATCCCGAGATCCAACCTAC	57.5	
<i>PepT1 F</i> ²	TCCCHCTHCCATGTTCTGG	58.6	914
<i>PepT1 R</i> ²	GCCTGTGARTAGMGAACCTCCA	62	
<i>Pept1 F</i> ²	TTCTCCTACTATGGCATGMRAGC	61	697
<i>PepT1 R</i> ²	IGCCCAGTCCATCCAGT	59	
<i>Pept1 F</i> ²	TGGCTSGGIAAGTTCAAGAC	59	550
<i>PepT1 R</i> ²	IGCCCAGTCCATCCAGT	59	

¹ Referencia: Regina *et al.* (2014)² Referencia: este estudio

Cuadro 3. Perfil térmico para la amplificación de regiones del PepT 1

	Procesos	Activación	Desnaturalización	Hibridación	Polimeración	Extensión final
A	Ciclos			35		
	Temp.	95 °C	95°C	54 °C	72 °C	72°C
				55°C		
				56°C		
B	Tiempo	5 min	45 s	30 s	45 s	5 min
	Ciclos			35		
	Temp.	95 °C	95°C	54 °C	72°C	72°C
				55°C		
C	Tiempo	5 min	45 s	45s	1 min 30s	5 min
	Ciclos			35		
	Temp.	95 °C	95 °C	55°C	72 °C	72 °C
				56°C		
				57°C		
				58°C		
	Tiempo	5 min	30 s	45 s	1 min	5 min

A: Ciclos térmicos para amplificar de 18 sRNA F, R (200 pb); B: Ciclos térmicos para amplificar Pept1 F2, R3 (914 pb); C: Ciclos térmicos para amplificar Pept1 F3, R1 (697)

migración electroforética en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y sumergido en una solución TAE 1X, para ser revelado en un transluminador. Los productos amplificados fueron secuenciados por la empresa Macrogen (USA).

Análisis *in silico*

Las secuencias de nucleótidos se analizaron con el programa CodonCode Aligner. Las secuencias de aminoácidos fueron predichas utilizando los programas ExPASy

Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>).

Extracción de Proteínas y Migración en Gel de Poliacrilamida

En la extracción de proteínas intestinales se utilizó el reactivo Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, USA), siguiendo el protocolo del fabricante. Las proteínas extraídas fueron separadas por electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-PAGE) mediante un sistema vertical mini OmniPAGE

(Cleaver Scientific®, Warrickshire, UK) durante 3 h a 90v al 12% de gel.

Purificación y Digestión de Péptidos

Las bandas fueron extraídas y digeridas siguiendo el protocolo descrito por Shevchenko *et al.* (2007) modificado. Las muestras fueron hidratadas con agua grado HPLC con TFA y se les adicionó el mismo volumen de matriz R-cyano-4 hydroxycynamic (á-CHCA, Sigma Aldrich) (10 mg/ml) (V/V), se homogenizaron cuidadosamente y fueron colocadas en el spot de la Opti TOF® placa MALDI.

Análisis por MALDI TOF/TOF

La identificación de los péptidos se realizó con un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF 5800 (Applied Biosystems, SCIEX) en modo ion reflector positivo, con una intensidad de láser Nd:YAG de λ a 335 nm, frecuencia 200 Hz, 750 disparos por espectro y analizados dentro de un rango de masas entre 800 a 4000 m/z. Los péptidos obtenidos del procesamiento por doble fragmentación (MS/MS) fueron analizados mediante el software ProteinPilot 4.0. Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando la base de datos libre NCBI Blast a través de la plataforma protein blast.

RESULTADOS

PCR del PepT1 de Paiche

Todas las temperaturas de hibridación y los ciclos térmicos utilizados resultaron en productos del tamaño esperado para cada juego de iniciadores, excepto el último iniciador (Cuadro 2). Se observaron bandas definidas de 200 pb para los iniciadores controles 18S ARNr F y 18S ARNr R (Figura 1a). Se observaron bandas definidas de 697 pb para los iniciadores degenerados PepT1 F3 y PepT1 R1 en todas las temperaturas de hibridación probadas (Figura 1b). También se ob-

servó hibridación para los iniciadores degenerados PepT1 F2 y PepT1 R3 mostrando un producto de 914 pb (Figura 1c).

Identificación del PepT1 en Tejidos

Se observaron bandas definidas correspondientes a productos de 914 pb, que fueron amplificados a partir del aislamiento de ARNm del intestino anterior, medio y posterior. No hubo presencia del producto en bazo, hígado y riñón (Figura 2).

Análisis Bioinformático de las Secuencias

Los fragmentos de ADNc del PepT1 del paiche fueron secuenciados, analizados y traducidos en sus secuencias de aminoácidos potenciales. Se determinaron dos secuencias consenso de tamaño de 357 pb (118 aa) y 459 pb (152 aa), como se muestra en la Figura 3.

Las secuencias parciales de nucleótidos exhibieron una alta similitud de secuencia con el PepT1 del *Scleropages formosus* (GenBank XM_018729534.1). En particular, el primer fragmento del gen de ADNc del PepT1 que exhibió un 84% de similitud con el sfPepT1, y de aproximadamente 78% de similitud con los demás teleosteos. Similarmente, el segundo fragmento exhibió un 73% de similitud con el sfPepT1. Además, las secuencias de aminoácidos predichas a partir de los fragmentos exhibieron una similitud de 81% con la secuencia de aminoácido del sfPepT1 (Cuadro 4).

Identificación por MALDI TOF/TOF PepT1

El análisis por MALDI TOF/TOF mostró un total de 15 secuencias correspondientes al PepT1, en particular las secuencias IRN IKFGDV VAKPEEGANAIR, NVIISYGNETTNELNVMGK y TYEIFKDIKTKPEEGANAIR por el nivel de identidad 100% y un valor de E. de 3×10^{-12} , al ser comparada con la secuencia de *Poecilia*

Cuadro 4. Similitud de las secuencias del gen del PepT1 del paiche frente a otras secuencias del gen de PepT1 de peces con respecto a los nucleótidos y aminoácidos que codifican la proteína del PepT1 (Blast)

Especies	Fragmento 1 del PepT1 de paiche		Fragmento 2 del PepT1 de paiche	
	Similitud de nucleótidos (%)	Similitud de aminoácidos (%)	Similitud de nucleótidos (%)	Similitud de aminoácidos (%)
<i>Scleropages formosus</i>	84	81	73	55
<i>Anguilla japonica</i>	77	78	----	42
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	79	83	----	44
<i>Lates calcarifer</i>	80	83	----	39
<i>Ictalurus punctatus</i>	75	82	----	42
<i>Larimichthys crocea</i>	76	80	----	44
<i>Esox lucius</i>	77	82	----	43
<i>Oreochromis mossambicus</i>	77	80	----	42
<i>Oreochromis niloticus</i>	76	80	----	42
<i>Danio rerio</i>	----		----	42
<i>Cyprinus carpio</i>	----	74	----	41
<i>Salmo salar</i>	79	83	----	44
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	75	-----	----	----

reticulata, *Pelodiscus sinensis* y *Paralichthys olivaceus*, respectivamente, de la base de datos de Protein BLAST. Los resultados resumidos se presentan en el Cuadro 5.

DISCUSIÓN

La proteína transportadora de péptidos (PepT1) es responsable de la absorción de aminoácidos y oligopéptidos en el intestino, siendo importante en el crecimiento de peces (Verri *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2014); además de ser confirmada como marcador del metabolismo, especialmente de las proteínas (Liu, 2014), habiendo sido identificada en varias especies; sin embargo, su presencia en el paiche *A. gigas* era desconocida. En el presente estudio se logró identificar por primera vez las secuencias nucleotídicas parciales de la proteína transportadora PepT1 del intestino de esta especie.

En el presente estudio, se optimizaron los iniciadores degenerados PepT1 F3, PepT1 R1 y PepT1 F2, PepT1 R3, apreciándose bandas definidas a todas las temperaturas probadas. Esto se explica porque las temperaturas escogidas se encontraban 5 °C por encima o debajo de la temperatura de fusión (T_m). Así mismo, se sabe que temperaturas muy altas causan un mal alineamiento entre iniciadores provocando poco ADN amplificado y temperaturas muy bajas causan la amplificación de ADN inespecífico (Sambrook y Russell, 2001). Por otro lado, se consideró el uso de 18S ARNr como control interno para asegurar la correcta extracción de ARN y PCR de la muestra y así evitar los falsos negativos. Estudios indican que entre los controles internos más utilizados se encuentran el EFA, B-actina, GAPDH y 18 S ARNr siendo este último el menos variable (Fernandes *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2011).

Cuadro 5. Secuencias de aminoácidos identificadas por MALDI TOF/TOF (Protein BLAST)

Prec MW	Prec M Z	Secuencia de aminoácido	Especie	Ident	Nº Accesión
1197.712 6	1198.712 6	AIKNRFRHR	<i>Poecilia reticulata</i>	100	XP_008396824.1
1331.664 7	1332.664 7	LCRINFPLR	<i>Danio rerio</i>	100	NP_932330.1
999.4227	1000.422 7	TLAALGQKR	<i>Alligator mississippiensis</i>	100	XP_014455978.1
1318.675 7	1319.675 7	CIGFAIKNRIR	<i>Poecilia reticulata</i>	91	XP_008396824.1
1353.631 7	1354.631 7	DWAKEKYDKR	<i>Rhincodon typus</i>	88	XP_020367844.1
1514.763 7	1515.763 7	FCERFSYYGMR	<i>Esox lucius</i>	100	XP_012993296.1
1217.525 6	1218.525 6	AVALVVFISGSR	<i>Ictalurus punctatus</i>	100	XP_017337526.1
1197.712 6	1198.712 6	AENGGTQTRPR	<i>Paralichthys olivaceus</i>	100	XP_019960053.1
1633.763 7	1634.763 7	TQNQEFNITPVDVR	<i>Rhincodon typus</i>	100	XP_020367844.1
1814.958 6	1815.958 6	KNMEKDKMGMAIESR	<i>Nothobranchius furzeri</i>	100	XP_015807884.1
1789.936 6	1790.936 6	WTLQATTMNGQIGLLK	<i>Labrus bergylta</i>	100	XP_020500572.1
2179.145 8	2180.145 8	QPEHGPERKRDQVEMER	<i>Salmo salar</i>	100	NP_001140154.1
2322.107 7	2323.107 7	TYEIFKDIKTKPEEGANAIR	<i>Paralichthys olivaceus</i>	100	XP_019960053.1
2227.095 7	2228.095 7	NVIISYGNETTNNLLNVMGK	<i>Pelodiscus sinensis</i>	100	XP_006128192.1
2322.107 7	2323.107 7	IRNIKFGDVVAKPEEGANAI R	<i>Poecilia formosa</i>	100	XP_007565446.1

Se determinó la presencia del ARN mensajero del PepT1 en intestino (anterior, medio y posterior) del paiche evidenciada en bandas del tamaño de 914 pb; sin embargo, no se identificó en riñón, hígado y bazo. Resultados similares fueron presentados por Verri *et al.* (2011), quienes indican que la distribución del PepT1 en peces teleósteos se da principalmente en el intestino y en menor grado en riñón, hígado, bazo y otros órganos o tejidos, pudiendo diferir significativamente de un grupo de peces a otro. Además, se pue-

de observar una disminución de intensidad de bandas a lo largo del segmento del intestino (del anterior al posterior), pudiendo diferir con otros estudios que indican que la expresión del PepT1 disminuye a lo largo del segmento proximal al distal del lumen intestinal, representando la diferencia entre los segmentos en la absorción de proteínas (Shen *et al.*, 2001; Terovala *et al.*, 2009; Ostaszewska *et al.*, 2010). Sin embargo, estudios cuantitativos basados en qPCR en tiempo real son necesarios para completar el estudio.

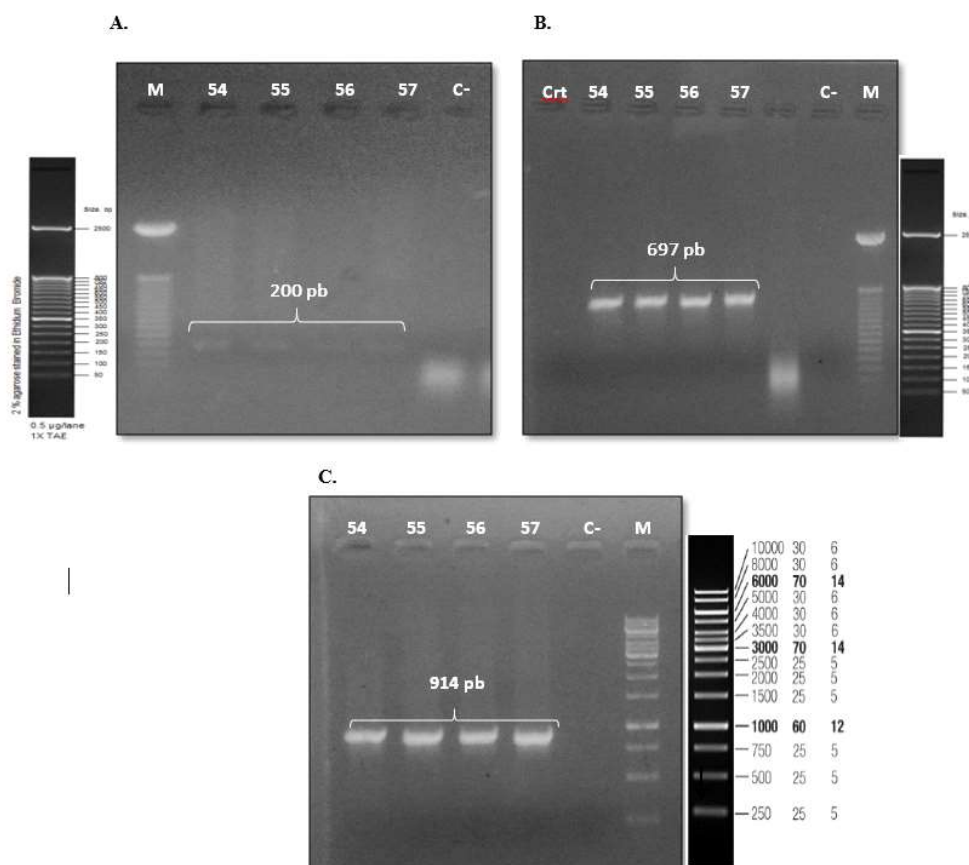


Figura 1. Migración en gel de agarosa de los productos obtenidos por PCR. A. Productos de la amplificación con iniciadores 18s ARNr (F, R) para la determinación de la temperatura de hibridación. M: marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen), 54, 55, 56 y 57: Muestras amplificadas a diferentes temperaturas de hibridación, C-: control negativo. B. Productos de la amplificación con iniciadores degenerados PepT1 F3 y PepT1 R1. Crt: Control de la transcriptasa reversa; 54, 55, 56, 57: Muestras amplificadas a diferentes temperaturas de hibridación; M: Marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen), C-: control negativo. C. Productos de amplificación con los iniciadores degenerados PepT1 F2 y PepT1 R3. 54, 55, 56, 57: Muestras amplificadas a diferentes temperaturas de hibridación; M: marcador de peso molecular de 1 Kb (Thermo Fisher); C-: control negativo

Las secuencias consenso del fragmento 1 y 2 mostraron una identidad con la secuencia del ARNm del PepT1 del *Scleropages formosus* de 84 y 73%, respectivamente. Esto demuestra una alta similitud de nucleótidos con el paiche, confirmando de esta manera su parentesco familiar Osteoglossidae. Además, estos datos consti-

tuyen una primera evidencia de la presencia del producto de ARNm relacionado con el PepT1 en la mucosa intestinal en el paiche.

La proteómica busca estudiar las proteínas totales presentes en una célula, tejido o fluido corporal en un momento dado, ya sea por abundancia, actividad, estructura, estado

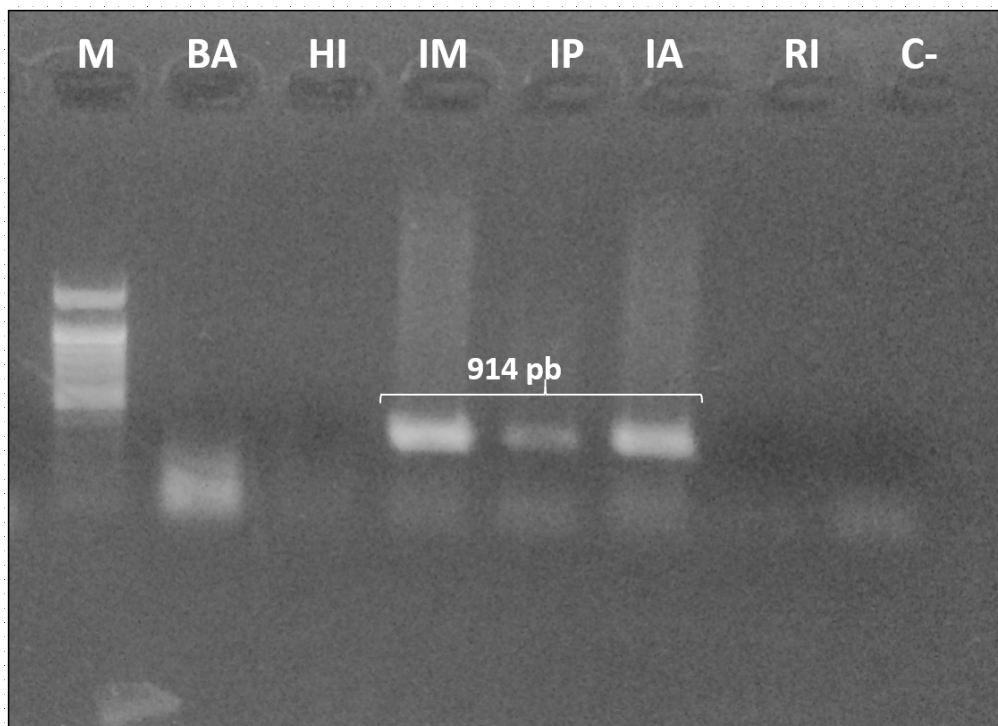


Figura 2. Distribución del PepT1 en tejidos del paiche con los iniciadores F3, R1. M: Marcador de peso molecular de 100 pb (Thermofisher); BA: Bazo; HI: Hígado; IM: Intestino medio; IP: Intestino posterior; IA: Intestino anterior; RI: Riñón; C-: Control negativo

de modificación postraducciona l o de otro tipo (Kusman *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2011). Los hallazgos del presente estudio a través de la espectrometría de masas MALDI TOF/TOF confirmaron la presencia de la proteína transportadora de péptidos (PepT1) al obtener secuencias peptídicas homólogas al PepT1 de varias especies de peces. Esta técnica fue utilizada por Zhang *et al.* (2016) quienes identificaron proteínas diferenciales en las vellosidades y criptas del intestino entre ratones *knockout* y *wildtype* para el PepT1. Por otro lado, Cueva (2016) utilizó esta herramienta, la que le permitió identificar neurohormonas involucradas en la reproducción, así como identificación de proteínas asociadas a la inmunidad y estrés en paiche, abriendo la vía para futuros trabajos de caracterización de otras proteínas de interés.

CONCLUSIONES

- Se logró identificar y caracterizar parcialmente la proteína transportadora de péptidos PepT1 en el intestino de paiche *A. gigas*.
- La identificación del *pept1* mediante la espectrometría de masas MALDI TOF/TOF puede ser una buena alternativa a los métodos tradicionales, ya que es sensible, y su alta precisión en la medición de las masas y la secuenciación masiva de péptidos reduce los problemas de identificación de proteínas y péptidos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa Acuicultura de Huaura S.A.C por brindar el material biológico. Al MSc Max Salvatierra

A. Fragmento 1

TGG	GGG	AGA	CCA	GTT	TGA	GGA	CCA	TCA	GGA	GAA	GCA	GCA	GAG	CAC	CTT	CTT	CTC	TGT	57
G	G	D	Q	F	E	D	H	Q	E	K	Q	Q	S	T	F	F	S	V	
CTT	CTA	CCT	GTC	CAT	CAA	TGC	AGG	TAG	TCT	CCT	GTC	CAC	CAT	CAT	CAC	TCC	AAT	CCT	114
F	Y	L	S	I	N	A	G	S	L	L	S	T	I	I	T	P	I	L	
CAG	AGC	CCA	AAA	ATG	TGG	GGC	CAC	CCA	ACA	GGA	CTG	TTA	CCC	ACT	GGC	CTT	CGG	AGT	171
R	A	Q	K	C	G	A	T	Q	Q	D	C	Y	P	L	A	F	G	V	
CCC	CGC	TAT	CCT	TAT	GAT	AGT	TGC	CCT	CAT	TGT	GTT	CAT	CAT	GGG	CAG	TGG	CAT	GTA	228
P	A	I	L	M	I	V	A	L	I	V	F	I	M	G	S	G	M	Y	
CAA	CAA	AAC	TGA	CCC	GGA	GGG	AAA	CAT	CAT	GCT	AAA	AGT	CTG	TAA	ATG	CAT	TGG	ATT	285
N	K	T	D	P	E	G	N	I	M	L	K	V	C	K	C	I	G	F	
TGC	ACT	GAA	GAA	CCG	CTT	CAA	GCA	CAG	GAG	CAG	CAA	GTA	CCC	GAA	AAG	GGA	GCA	TGG	342
A	L	K	N	R	F	K	H	R	S	S	K	Y	P	K	R	E	H	G	
GGG	GGG	GGG	GGG	CCC															357
G	G	G	G																

B. Fragmento 2

CAA	AAC	CCT	GCC	TAC	ATT	CCC	ATC	AGA	ATC	CCA	AAG	CCA	GGT	GAA	GTT	TTT	GAA	CAT	57
K	T	L	P	T	F	P	S	E	S	Q	S	Q	V	K	F	L	N	M	
GAG	GAA	TGA	ACA	CAT	GTC	AGT	TAG	AGT	CAA	TCA	GGA	TCC	CGC	TAT	AGA	AAT	TGG	GCC	114
R	N	E	H	M	S	V	R	V	N	Q	D	P	A	I	E	I	G	P	
ATA	TGA	GGC	AAC	ACC	TGA	CTT	CTT	CAC	TTT	TGA	CAA	GAT	GGA	AAT	GAA	TGT	TGC	TTT	171
Y	E	A	T	P	D	F	F	T	F	D	K	M	E	M	N	V	A	F	
TAA	CAA	CGG	TGC	ACC	AGT	GTT	ATT	CAG	TCT	TGA	AAA	AAA	AAT	GAG	GCA	GAT	GCT	CTT	228
N	N	G	A	P	V	L	F	S	L	E	K	K	M	R	Q	M	L	L	
GAT	AAC	TCC	TGA	CAG	CAG	TGC	ATA	TTT	GAT	AGA	GGA	TTT	ATC	TAA	AAA	ACC	AGA	AAA	285
I	T	P	D	S	S	A	Y	L	I	E	D	L	S	K	K	P	E	K	
AGG	AGA	AAA	TGC	CAT	CAG	ATT	TGT	CAA	TGG	TAT	GCC	TTT	TCA	AGT	CAA	CGT	GAC	AGT	342
G	E	N	A	I	R	F	V	N	G	M	P	F	Q	V	N	V	T	V	
AGG	CTC	AAA	AGA	CCT	GGG	CAT	CAT	TGA	TCC	TTC	AGC	TGC	AAG	CAA	CTA	CAC	CAT	GCT	399
G	S	K	D	L	G	I	I	D	P	S	A	A	S	N	Y	T	M	L	
TCA	AAA	GGG	AGA	GGC	TAA	ATT	TGT	CAT	TAG	CTA	CCA	TGA	TGG	AAG	AAA	CTG	TGA	ATT	456
Q	K	G	E	A	K	F	V	I	S	Y	H	D	G	R	N	C	E	F	
CTC																			459

Figura 3. Secuencias de nucleótidos de los fragmentos del PepT1 de paiche divididos en codones, con sus respectivas secuencias de aminoácidos predichos. A: Fragmento 1, amplificado con los iniciadores degenerados PepT1 F3 y PepT1 R1. B: Fragmento 2, amplificado con los iniciadores degenerados PepT1 F2 y PepT1 R3

Alor por el apoyo brindado. Circulo de investigación en biotecnología molecular para el desarrollo y la sostenibilidad de los sectores acuícolas del Perú (132-2015-FONDECYT.

LITERATURA CITADA

1. **Bakke S, Olderbakk AE, Gómez P, Verri T, Kousoulaki K, Aksnes A, Rønnestad I. 2010.** Dietary protein hydrolysates and free amino acids affect the spatial expression of peptide transporter PepT1 in the digestive tract of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp Biochem Phys B* 156: 48-55. doi: 10.1016/j.cbpb.2010.02.002
2. **Bucking C, Schulte P. 2012.** Environmental and nutritional regulation of expression and function of two peptide transporter (PepT1) isoforms in a euryhaline teleost. *Comp Biochem Phys A* 161: 379-387. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.12.008
3. **Cueva MD. 2016.** Aplicación de la espectrometría de masas MALDI TOF/TOF a la endocrinología, inmunología y patología del paiche *Arapaima gigas*. Tesis de Magíster. Tumbes, Perú: Univ Nacional de Tumbes. 73 p.
4. **Daniel H. 2004.** Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol* 66: 361-384. doi: 10.1146/annurev.physiol.66.032102.144149
5. **[DIDITT] Dirección de Investigación, Innovación, Desarrollo y Transferencia Tecnológica. 2017.** Pienso para paiche «*Arapaima gigas*». Vigilancia tecnológica e inteligencia competitiva. Boletín online N.º 01. [Internet]. Disponible en: https://www.itp.gob.pe/archivos/vtic/ACUICULTURA_001-2017.pdf
6. **Fernandes JM, Mommens M, Hagen O, Babiak I, Solberg C. 2008.** Selection of suitable reference genes for real-time PCR studies of Atlantic halibut development. *Comp Biochem Phys B* 150: 23-32. doi: 10.1016/j.cbpb.2008.01.003
7. **Gatlin DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowki K, Gaylord TG, Hardy RW, Hernan E, et al. 2007.** Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac Res* 38: 551-579. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x
8. **Gilbert ER, Wong EA, Webb KE. 2008.** Peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. *J Anim Sci* 86: 2135-2155. doi: 10.2527/jas.2007-0826
9. **Kiela PR, Ghishan FK. 2016.** Physiology of intestinal absorption and secretion. *Best Pract Res Cl Ga* 30:145-59. doi: 10.1016/j.bpg.2016.02.007
10. **Liu Z, Zhou Y, Feng J, Lu S, Zhao Q, Zhang J. 2013.** Characterization of oligopeptide transporter (PepT1) in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Comp Biochem Phys B* 164: 194-200. doi: 10.1016/j.cbpb.2012.11.008
11. **Liu Z, Zhou Y, Liu S, Zhao Q, Feng J, Lu S, Xiong G, et al. 2014.** Characterization and dietary regulation of oligopeptide transporter (PepT1) in different ploidy fishes. *Peptides* 52: 149-156. doi: 10.1016/j.peptides.2013.12.017
12. **Oeda AP, Vitti G, Rodrigues V. 2015.** Alimentacao e nutricao do pirarucu (*Arapaima gigas*). EMBRAPA Pesca e Aquicultura. Doc 18. Brasil: EMBRAPA. 26 p.
13. **Ostaszewska T, Szatkowska I, Verri TP, Dabrowski K, Romano A, Barca I, Muszynska M, et al. 2009.** Cloning two PepT1 cDNA fragments of common carp, *Cyprinus carpio* [Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae] *Acta Ichthyol Piscat* 39: 81-86. doi: 10.3750/AIP2009.39.2.01
14. **Ostaszewska T, Kamaszewski M, Grochowski P, Dabrowski K, Verri T, Aksakal E, Szatkowska I, et al. 2010.** The effect of peptide absorption on PepT1 gene expression and digestive

- system hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp Biochem Phys A 155: 107-114. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.10.017
15. **Rebaza M, Rebaza C, Deza S. 2010.** Densidad de siembra para cultivos de paiche en jaulas flotantes. Aquavision 6: 26-27.
16. **Regina F, Oliveira D, Warlen P, Alves de Costa F, Foncesa V, DalPai M. 2014.** Expression of growth-related factors in skeletal muscle of pirarucu (*Arapaima Gigas*) during growth. J Aquac Res Dev 5: 6. doi: 10.4172/2155-9546.1000272
17. **Romano A, Barca A, Storelli C, Verri T. 2014.** Teleost fish models in membrane transport research: the PEPT1 (SLC15A1) H⁺-oligopeptide transporter as a case study. J Physiol 592: 881-897. doi: 10.1113/jphysiol.2013.-259622
18. **Rønnestad I, Gavaia PJ, Viegas CS, Verri T, Romano A, Nilsen TO, Jordal AO, et al. 2007.** Oligopeptide transporter Pept1 en Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): cloning, tissue expression and comparative aspects. J Exp Biol 210: 3883-3896. doi: 10.1242/jeb.007898
19. **Rønnestad I, Murashita K, Kottra G, Jordal AE, Narawane S, Jolly C, Daniel H, et al. 2010.** Molecular cloning and functional expression of Atlantic salmon peptide transporter 1 in *Xenopus* oocytes reveals efficient intestinal uptake of lysine-containing and other bioactive di- and tripeptides in teleost fish. J Nutr doi: 10.3945/jn.109.118240
20. **Rønnestad I, Akiba Y, Kaji I, Kaunitz JD. 2014.** Duodenal luminal nutrient sensing. Curr Opin Pharmacol 19: 67-75. doi: 10.1016/j.coph.2014.07.010
21. **Sambrook J, Russell D. 2001.** Molecular cloning. A laboratory manual. New York, USA: Cold Spring Laboratory Press. 999 p.
22. **Segura M, Chel L, Betancur D. 2010.** Effect of digestion on bioavailability of peptides with biological activity. Rev Chil Nutr 37: 386-391. doi: 10.1080/87559129.2011.563395
23. **Shen H, Smith DE, Brosius FC. 2001.** Developmental expression of PEPT1 and PEPT2 in rat small intestine, colon, and kidney. Pediatr Res 49: 789-795. doi: 10.1203/00006450-200106000-00013
24. **Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen J, Mann M. 2007.** In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat Protocols 1: 2856-2860. Doi: 10.1038/nprot.2006.468
25. **Storelli C, Vilella S, Romano MP, Maffia M, Cassano G. 1989.** Brush-border amino acid transport mechanisms in carnivorous eel intestine. Am J Physiol 257: 506-510 doi: 10.1152/ajpregu.-1989.257.3.R506
26. **Su Y, Zhang R, Dong J, Yang C. 2011.** Evaluation of internal control genes for qRT-PCR normalization in tissues and cell culture for antiviral studies of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Fish Shellfish Immun 30: 830-835. doi: 10.1016/j.fsi.2011.01.006
27. **Terova G, Corá S, Verri T, Rimoldi S, Bernardini G, Saroglia M. 2009.** Impact of feed availability on PepT1 mRNA expression levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 294: 288-299. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.06.014
28. **Thamotharan M, Gomme J, Zonno V, Maffia M, Storelli C, Ahearn GA. 1996.** Electrogenic, proton-coupled, intestinal dipeptide transport in herbivorous and carnivorous teleosts. Am J Physiol 270: 939- 947. doi: 10.1152/ajpregu.-1996.270.5.R939
29. **Verri T, Kottra G, Romano A, Tiso N, Peric M, Maffia M, Boll M, et al. 2003.** Molecular and functional characterisation of the zebrafish (*Danio rerio*) PEPT1-type peptide transporter. Febs Lett 549: 115-116. doi: 10.1016/S0014-5793(03)-00759-2

30. **Verri T, Terova G, Dabrowski K, Saroglia M. 2011.** Peptide transport and animal growth: the fish paradigm. *Biology Lett* 7: 597-600. doi: 10.1098/rsbl.2010.1164
31. **Wang J, Yan X, Lu R, Meng X, Nile G. 2017.** Peptide transport 1 (Pept1) in fish: a review. *Aquac Fisheries* 2: 193-206. doi: 10.1016/j.aaf.2017.06.007
32. **Wright PC, Noirel J, Ow S, Fazeli A. 2011.** A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology* 77: 738-765. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.11.012
33. **Zhang Y, Viennois E, Zhang M, Xiao, Kwon M, Walter L, Garg P, et al. 2016.** PepT1 Expression helps maintain intestinal homeostasis by mediating the differential expression of miRNAs along the crypt-villus axis. *Sci Rep* 6: 27119. doi: 10.1038/srep27119